Utjecaj imobilizacije stanica kvasca na prisutnost biogenih amina u pjenušavim vinima vinogorja Kutjevo proizvedenim različitim postupcima sekundarne fermentacije

Sablek, Stjepan

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:884188

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Stjepan Sablek, apsolvent
Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo
Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

UTJECAJ IMOBILIZACIJE STANICA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGENIH AMINA U PJENUŠAVIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO PROIZVEDENIM RAZLIČITIM POSTUPCIMA SEKUNDARNE FERMENTACIJE

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE J.J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Stjepan Sablek, apsolvent
Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo
Smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

UTJECAJ IMOBILIZACIJE STANICA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGENIH AMINA U PJENUŠAVIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO PROIZVEDENIM RAZLIČITIM POSTUPCIMA SEKUNDARNE FERMENTACIJE

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu diplomskog rada:
Doc. dr. sc. Vladimir Jukić, predsjednik
Prof. dr. sc. Borislav Miličević, mentor
Doc. dr. sc. Mato Drenjančević, član

Osijek, 2018.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. PREGLED LITERATURE 2

2.1. Pjenušava vina 2
2.1.1. Kategorizacija pjenušavih vina 3
2.1.2. Postupci proizvodnje pjenušavih vina 4
2.1.2.1. Prirodni pjenušac od mladog nepotpuno provrelog vina 5
2.1.2.2. Prirodni pjenušac na bazi provrelog zrelog vina 5
2.1.2.3. Proizvodnja osnovnog vina za pjenušac 5
2.1.2.4. Priprema i dodavanje šećernog sirupa i vinskog kvasca 6
2.1.2.5. Naknadno vrenje u boci 6
2.1.2.6. Degoržiranje 6
2.1.2.7. Industrijska proizvodnja pjenušaca u metalnim tankovima 7
2.1.3. Sorte vinove loze za proizvodnju pjenušavih vina 8
2.1.3.1. Graševina 8
2.1.3.2. Rajnski rizling 9
2.1.3.3. Pinot bijeli 10
2.1.3.4. Pinot sivi 11
2.1.3.5. Chardonnay 12

2.2. Biogeni amini 13
2.2.1. Prisutnost biogenih amina u pjenušavom vinu 13
2.2.2. Nastanak biogenih amina u pjenušavom vinu 14
2.2.3. Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih amina u pjenušavom vinu 15
2.2.4. Toksičnost biogenih amina 16

3. MATERIJAL I METODE 18

3.1. MATERIJAL 18
3.1.1. Pjenušavo vino 18

3.2. METODE 22

3.2.1. Fizikalno kemijske metode 22
3.2.2. HPLC metoda analize 23

4. REZULTATI 24

5. RASPRAVA 26

5.1. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na fizikalno-kemijske osobine pjenušavog vina 26

5.2. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na prisutnost biogenih amina u pjenušavom vinu 28

6. ZAKLJUČAK 30

7. LITERATURA 31

8. SAŽETAK 34

9. SUMMARY 35

10. POPIS TABLICA 36

11. POPIS SLIKA 37

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 38

BASIC DOCUMENTATION CARD 39

1. UVOD

Pjenušava vina su vina koja sadrže određenu količinu CO_2, što znači da se vino u boci nalazi pod određenim tlakom, a jačina pritiska ovisi o tipu vina odnosno o količini CO_2.

Za proizvodnju pjenušavih vina znali su još i Rimljani, jer pjesnik Vergilije u jednom svom spjevu govori o vinu koje se u čaši pjeni, a u iskopinama iz doba Rimljana nađene su čaše slične današnjima za pjenušava vina (Radovanović, 1970.).

Tehnološki postupak proizvodnje šampanjca u početku je bio znatno primitivniji nego danas, pa je i kvaliteta prvobitnog šampanjca bila lošija od današnje. Šampanjsko pjenušavo vino je kvalitetom ubrzo steklo svjetski glas i visoku cijenu na svjetskom tržištu. Na zahtjev Francuske šampanjac je zaštićen posebnim međunarodnim ugovorom poslije prvog svjetskog rata (http://www.krizevci.net/vinograd/htm/sav_pjenusava_vina.html).

Izraz "champegnoise", "champagne", i sl. mogu se koristiti samo za prirodna pjenušava vina klasičnom metodom proizvedena u Champagni. Pjenušci iz drugih sedam područja Francuske označavaju se kao "vins mousseux", a gazirana vina "vins mousseux gazeifies". Istoznačna oznaka u Italiji je "metodo classico" ili "metodo tradizionale", a oznaka "Asti" smije se koristiti samo za kvalitetna prirodna pjenušava vina iz istoimene talijanske provincije.

U Španjolskoj izraz "Cava" ima isto značenje kao zaštićeni pojam za kakvoću i tehnologiju. SAD, Australija i Novi Zeland prihvatile su obvezu poštivanja zaštite imena "Champagne", te za istu tehnologiju koriste pojmove "bottle fermented" ili "classic method", uz oznake kontroliranog podrijetla u skladu s njihovim zakonima (www.veleri.hr).

Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na sadržaj biogenih amina u pjenušcu.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Pjenušava vina

Priču o pjenuščima najčešće započinjemo s benediktincem Dom Pierreom Perignonom (1638. - 1715.) i gradom Epernayom u Champagni, iako su oni postojali stoljećima prije. Italija je zemlja koja se može pohvaliti najbolje sačuvanom arhivskom građom na tu temu. Spomenut ćemo samo neke: Vergilije (70. - 19. prije Krista) autor je ovih poznatih stihova: « Et ille impiger hausit, spumante pateram et pleno se produit auro; post alii proceres» (Aen., I, 7,38 - 40). "I on se pojavi sa zlatnim kaležom i ne odugovlačeći ni trenutka iskapi kalež pun pjenušca; za njim ispiše i ostali plemenitaši". Proporcije (47. - 15. prije Krista) piše: «Largius effuso madead tibi mensa Falerno, spumet et aurato mollius in alice.» (El. II, 33, 39-40). "Nek je tvoj stol obilnije obliven i nek se na njemu slađe pjenuša Falerno u zlatnom kaležu". Falerno je najstarija zaštita kontroliranog podrijetla Rimskog doba, zbog svoje kakvoće i opće poznatosti u rimskom carstvu kojem je Plinije (77. prije Krista) odredio zemljopisnu zonu proizvodnje (www.veleri.hr).

Postoje dokazi da je jedan od pjenušaca iz Falerna (proizvodio se dodavanjem mošta od prosušenog grožđa sorte Meroe, podrijetlom iz Etiopije, djelomice profermentiranom vinu) poslužen na jednoj od svečanih večera organiziranih u čast Kleopatre i Cezara. Pjenušac je dakle star kao i Rimljani, a u to vrijeme nazivali su ga još «aigleucos» i «acinatic». Prvi su proizvodili prekidanjem vrenja, uranjanjem amfora od pečene gline u hladnu vodu.

U Pompejima je otkriven podrum s prolazom kroz koji je stalno protjecala hladna voda u koju su uranjani «doliumi» s moštom da bi se osiguralo pjenušanje. Poznavali su i tehnologiju dodavanja prosušenog grožđa ili ukuhanog mošta djelomice prevrelim vinima. Ova su vina opisivali riječima «spumans», «spumescens», «saliens», «titllans», a upućuju na perlanje i pjenu.

Kao i svugdje, tako i u Francuskoj, redovnici su bili promicatelji, poklisari znanja, usmjereni i na proizvodnju kvalitetnih vina. Vino se prinosilo i blagoslivljalo pod misom, a njime se i uspješno trgovalo. Između 898. i 1825. kraljevi Francuske (njih 37) krunjeni su u katedrali u Rheimsu, srcu Champagne, a vina su bila obvezni dio svečanosti.

Zato ne iznenađuje da ovaj stari proizvod za tvorca ima slijepog benediktinca Dom Perignona, podrumara Opatije blizu grada Epernaya.

Kao vrsni podrumar, godine 1668. obznanio je svoj uspjeh proizvodnje bijelog, bistrog pjenušca. Uveo je kupažiranje vina različitih sorata i iz različitih vinograda, želeći dobiti bijelo vino s potencijalom za čuvanje.

Uočio je i dva najvažnija čimbenika za očuvanje nastalog ugljičnog dioksida: čep i staklenu bocu dovoljno jaku da izdrži tlak u njoj. No, tek nakon dva stoljeća proizvodnja pjenušaca se intenzivirala u Champagni, a potom i u drugim zemljama (Italija 1865., Španjolska 1872.). Interesantno je spomenuti, obzirom na čvrste veze Engleske i Francuske i veliku potrošnju ovih vina u Engleskoj, kako Francuzi upravo Englezima duguju zahvalnost za otkriće staklene boce koja se i danas takova koristi.

Ovo se otkriće vezuje uz ime Sir Kenelma Digby-a iz 1623. godine, a novina u tehnologiji proizvodnje stakla vezana je za upotrebu ugljena umjesto drva (razvija se viša temperatura u pećima u kojima se dobiva staklo). Čep je podrijetlom iz Španjolske, otprilike u isto vrijeme kad i staklo, tzv. «verre anglais». Za ovo vrijeme vežemo nastanak i početke proizvodnje Bakarske vodice, iako neki autori, njene početke vezuju uz Napoleonove oficire koji su vjerojatno tom poslu naučili tadašnje bakarske patricije (1810.).

Spomenimo i da su se prema zapisima i predaji, na bečkom dvoru pila i glasovita slatka pjenušava vina iz okolice Šibenika (www.veleri.hr).

2.1.1. Kategorizacija pjenušavih vina

Prema hrvatskom Zakonu o vinu pjenušava vina dijele se na:

- prirodna pjenušava vina
- gazirana pjenušava vina
- prirodna biser vina

Prirodna pjenušava vina i prirodna biser vina su vina čiji je sadržaj i pritisak ugljičnog dioksida u boci proizveden isključivo naknadnim vrenjem šećera u vinu.
Gazirana pjenušava vina su vina kojima je prilikom punjenja u boce dodan ugljični dioksid.

Pjenušavim vinima može se nakon završenog naknadnog vrenja dodati ekspedicioni liker, radi postizanja odgovarajućeg sadržaja neprovrelog šećera. (Zakon o vinu, NN96/03 s izmjenama i dopunama).

Tablica 1. Utjecaj sadržaja alkohola na odmjeravanje šećera pri šampanjizaciji (Radovanović, 1970.)

Količina alkohola u vinu, vol%	Potrebna količina šećera u g/l za dobivanje pritiska od:		
	5 bara	5,5 bara	6 bara
9	19	21	23
10	20	22	24
11	21	23	25
12	22	24	26

Prirodna pjenušava vina dijele se prema načinu proizvodnje na pjenušava vina nastala klasičnim metodom vrenja u boci i metodom vrenja u tankovima.

- klasična metoda – metoda vrenja u bocama (sekundarna fermentacija u boci), poznata kao champenoise metoda (tom metodom proizvode se šampanjci i samo pjenušci proizvedeni klasičnom metodom iz francuske pokrajine *Champagne* mogu se zvati šampanjcima)
- metoda vrenja u tankovima (sekundarna fermentacija u tanku) poznata kao *charmat* metoda (https://www.mladina.hr/mala-skola-pjenusaca/).

2.1.2. Postupci proizvodnje pjenušavih vina

Potupak proizvodnje ovisit će o tome kakvo pjenušavo vino želimo dobiti. Ako nam je konačni produkt prirodno pjenušavo vino ono se može proizvesti od mladog nepotpuno provrelog vina i od provrelog zrelog vina.

U prirodnim pjenušavim vinima tlak ugljičnog dioksida može doseći 5 bara. Nastaje sekundarnom fermentacijom i vinu daje posebnu osobinu pjenušanja koja je u vidnoj sferi važna, ali isto tako daje vinu jedan rezak i osvjžavajući okus.

Taj ugljični dioksid je u većoj mjeri otopljen ili vezan za spojeve u vinu, a u manjoj mjeri slobodan pa to omogućuje dugotrajniju prisutnost u čaši u obliku sitnih mjehurića (Sokolić, 1976.).

2.1.2.1. Prirodni pjenušac od mladog nepotpuno provrelog vina

U takvom postupku mlado neprovrelo vino stavlja se u šampanjske boce u kojima sekundarnom fermentacijom stvara ugljični dioksid i vrlo malo taloga. To je mlado vino dobiveno od mošta kvalitetnog grožđa koji se istaloži i bistri te lagano vrije na nižoj temperaturi. Vrenje treba prekidati filtracijom toliko puta da se sav virulentni potencijal kvasca i njegova aktivnost svedu na minimum. Nakon nekoliko mjeseci sekundarnom fermentacijom dobit ćemo pjenušac kakav se proizvodi u mnogim zemljama. U našim krajevima najpoznatiji takav pjenušac je bakarska vodica (Sokolić, 1976.).

2.1.2.2. Prirodni pjenušac na bazi provrelog zrelog vina

Taj je postupak proizvodnje pjenušca upotrebljavan još prije više od 300 godina u francuskoj pokrajini Champagni. Tijekom godina postupak je mijnjan, poboljšavan i usavršavan. Taj francuski pjenušac postao je vrlo popularan i tražen, pa je Francuska nakon prvog svijetskog rata međunarodnim ugovorima zaštitila ime šampanjac. Ono se od tada koristi isključivo za pjenušac proizveden u Champagni (Sokolić, 1976.).

2.1.2.3. Proizvodnja osnovnog vina za pjenušac

Temeljna vrsta vinove loze za proizvodnju šampanjskog pjenušca je burgundac crni kome se mogu dodatii druge vinske sorte u manjm količinama da se dobije kvalitetna sirovina za mošt koji bi trebao imati oko 20% šećera i 8‰ kiseline. Grožđe se odmah preša da se što manje obojenih tvari iz pokožice nađe u moštu (Sokolić, 1976.).

Takav mošt u koji dodajemo sumpor i selekcionirani vinski kvasac za niske temperature vrenja vrije u bačvama od 200 litara. Vino se zatim kupažira i tipizira te na kraju stabilizira hladnim postupkom. Redovito se pretače, po potrebi bistri i nakon godine dana dodaje se dio staroga vina kako bi bilo spremno za proizvodnju pjenušca (Sokolić, 1976.).

2.1.2.4. Priprema i dodavanje šećernog sirupa i vinskog kvasca

Šećerni sirup se dodaje temeljnom vinu u kome je potruno završen proces vrenja, dabi se izazvalo naknadno vrenje. Šećerni sirup pripremamo otapanjem šećera (saharoze) u manjoj količini vina do koncentracije od 50%. Vinski kvasac koji koristimo da se potakne naknadno vrenje u bocama mora biti selekcionirani, čist i umnožen u maloj količini vina uz dodatak 10% saharoze.

Količina sirupa koju treba dodati vinu treba biti točno i pažljivo određena, a o tome će ovisiti kakav pjenušac, s kojom količinom ugljičnog dioksida ćemo dobiti. Maksimalni tlak ugljičnog dioksida u boci smije biti do 5,5 bara jer jači bi uzrokovao pucanje staklenih boca. Dobro homogenizirana smjesa vina, šećernog sirupa i kvasca pomoću kružnih mješalica razlijeva se u šampanjske boce, čepi plutenim čepom i kao osiguranje se preko čepa stavlja metalna kapica (Sokolić, 1976.).

2.1.2.5. Naknadno vrenje u boci

Vodoravno položene boce stoje u podrumskim prostorijama u kojima je konstantna temperatura između 10 do 12ºC tijekom cijele godine. Takav vodoravan položaj boca drži stalno vlažnim pluteni čep pa je on nepropustan za ugljični dioksid. Sekundarna fermentacija započinje relativno brzo ali će se odvijati sporo zato što je niska temperatura i relativno visok udio alkohola u vinu (11-12%). Tako sporo vrenje omogućuj nastalom ugljičnom dioksidu da se dobro otopi i kemijski vezuje za vinske sastojke. Tijek vrenja se prati mjerenjem tlaka ugljičnog dioksida posebnim manometrom kroz čep. Kad provrije sav šećer doda vinu sadržaj alkohola narast će za 1%. Ako se dogodi da vrenje stane ponovno ga treba potaknuti protresanjem boca kako bi se aktivirao zaostali kvasac u talogu. Nastali vinski kamenac i preostali talog treba ukloniti iz boca koje za taj postupak pripremamo hlđenejm na -5ºC i postepeno okretanjem u okomiti položaj da bi talog ostao u grlu boce (Sokolić, 1976.).

2.1.2.6. Degoržiranje

Degoržiranje je postupak kojim se vještim otvaranjem boce, pod tlakom ugljičnog dioksida izbacuje talog nakupljen u grlu boce koji prethodno treba zalediti utapanjem u rashlađenu smjesu od -18ºC. Tu radnju obavljaju vješti i dobroobučeni radnici.

Količina vina koja je degoržiranjem izgubljena nadomješta se dodavanjem iste količine ekspedicionong likera. Ekspedicioni liker je pripravak od temeljnog vina, šećera, finog vinskog destilata i limunske kiseline u propisanim omjerima.

Nakon degoržiranja i dodavanja ekspedicionog likera boce se opet zatvaraju kvalitetnim plutenim čepom koji je osiguran metalnom kapicom i žicom. Potrebno je da radi harmonizacije sadržaja odleže još nekoliko mjeseci u hladnom podrumu (Sokolić, 1976.).

2.1.2.7. Industrijska proizvodnja pjenušaca u metalnim tankovima

Proizvodnja pjenušaca u metalnim tankovima znatno je brži, jednostavniji i jeftiniji način proizvodnje.

Danas je to češće korištena tehnologija jer ne zahtijeva podrumske prostorije, posebno obućenu radnu snagu niti toliko puno vremena. Francuzi su polovicom devetnajstog stoljeća počeli procese proizvodnje pjenušavih vina pojednostvljivati i prilagođavati industrijskoj proizvodnji. U početku su fermentaciju obavljali u autoklavima dok se u dvadesetom stoljeću nije osmislio brzi proces proizvodnje pjenušaca u metalnim tankovima.

Današnji pogoni vinarija za proizvodnju pjenušaca imaju uređaje za pasterizaciju, uređaje za rashlađivanje, baterije metalnih tankova sa dvostrukim stijenkama, uređaje za izobaričnu filtraciju, uređaje za punjenje boca pod pritiskom, posude za pripremu kvasca i šećernih sirupa. Tu su još razne cijevi, pumpe, sisaljke i mješalice koje su potrebne u procesu (Sokolić, 1976.).

U ovakvoj proizvodnji pjenušaca nema dodavanja ekspedicionog likera pa treba paziti na količinu dodanog šećera. Bazičnom se vinu dodaje šećerni sirup i kvasac koji uz povoljnu temperaturu (12-15ºC) izazovu nakndno alkoholno vrenje.

Kontrola postignutog tlaka se vrši manometrom i kad je on dovoljno visok prekida se fermentacija višednevnim hlađenjem vina u tanku na -5ºC. Ujedno se istim postupkom vrši stabilizacija pjenušca, kristalizira se vinski kamenac i odvaja talog. Pjenušac se skida s taloga izobaričnom filtracijom da ne dođe do gubitka ugljičnog dioksida. Time je postupak proizvodnje pjenušca u tankovima završen (Sokolić, 1976.).

Preostaje još samo punjenje boca pjenušcem rashlađenim na -1ºC koje se obavlja izobaričnom punilicom da se sačuva prisutan ugljični dioksid .

Kako je danas sav proces proizvodnje mehaniziran on je znatno kraći i traje 40-45 dana (Sokolić, 1976.).

2.1.3. Sorte vinove loze za proizvodnju pjenušavih vina

2.1.3.1. Graševina

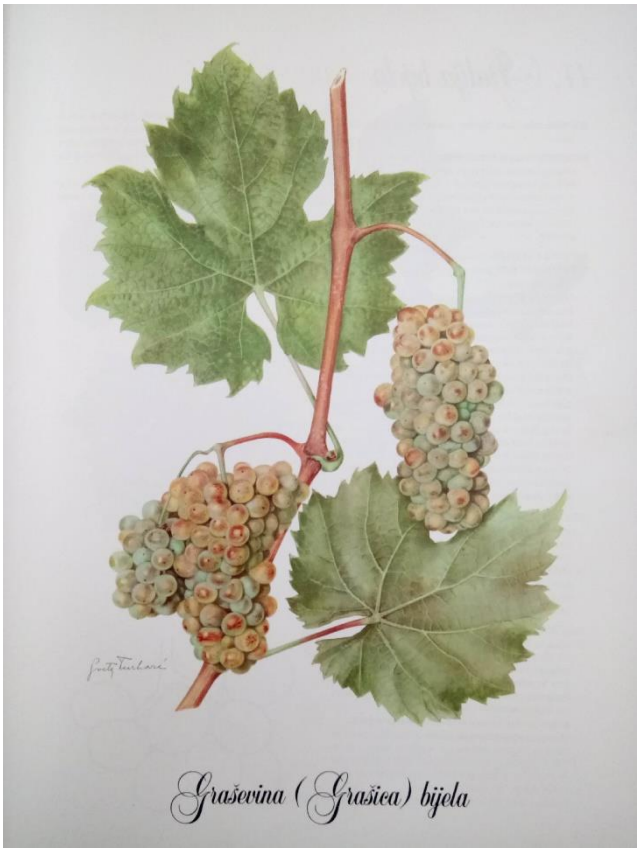
U Hrvatskoj je utemeljen naziv Graševina bijela, iako se u sjeverozapadnoj Hrvatskoj ponegdje upotrebljava i stari naziv Grašica (Mirošević i sur., 2011.).

Porijeklo joj se veže uz Francusku, odakle je prenesena u Heidelberg u Njemačkoj.

Uzgaja se u Mađarskoj, Austriji, sjevernoj Italiji, Švicarskoj, Hrvatskoj, Srbiji i Crnoj Gori odnosno u područjima umjerene klime gdje još može potpuno dozoriti.

Prikladna za srednje visoki, a osobito dvokraki sustav uzgoja, s rezom na dulje rodno drvo.

Daje fina vina prosječne ili natprosječne kakvoće, ugodnog sortnog mirisa i okusa, sa srednjim sadržajem kiselina. Kao zobatica nije prikladna (Mirošević i Turković, 2003.).



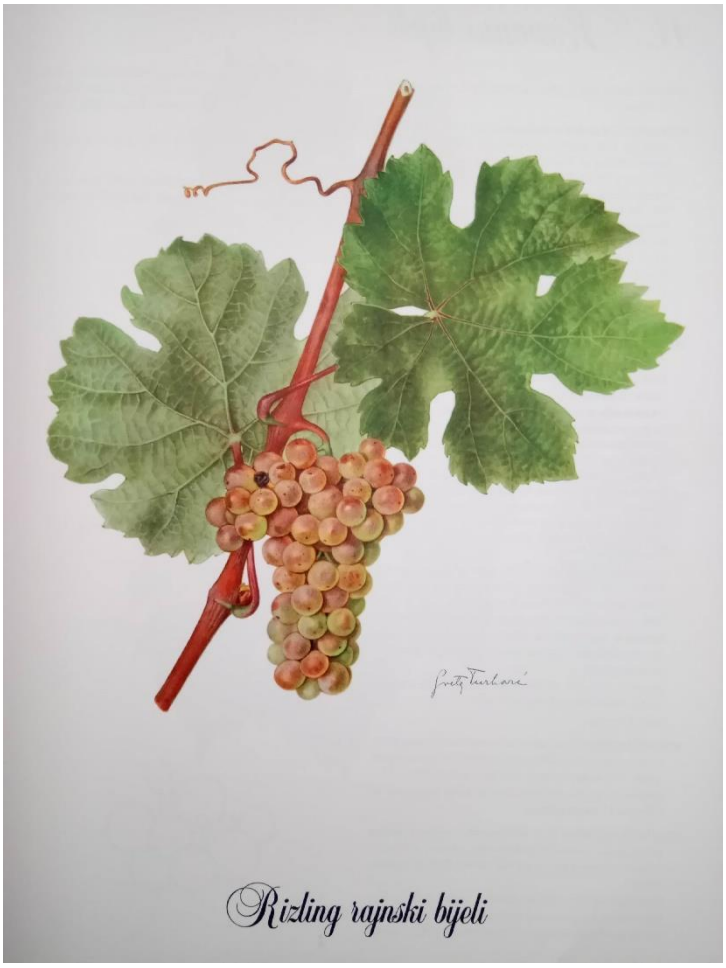
Slika 1. Graševina (izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)

2.1.3.2. Rajnski rizling

Potječe iz Njemačke, s Rajne, gdje je najviše rasprostranjen. Uzgaja se i u mnogom drugim vinorodnim zemljama umjerene klime.

Traži toplije južnije položaje; ne previše plodna tla, koja mogu biti i skeletna. Prikladan je za srednji ili viši sustav uzgoja, a reže se na kraće ili dulje rodno drvo. Otpornost prema smrzavicama i kasnim proljetnim mrazovima vrlo je dobra; prema gljivičnim bolestima srednja; u kišnoj jeseni rado trune. Daje fino, kvalitetno vino osobita sortna mirisa i okusa, koji je osobito intenzivan na području Rajne, a posebno od grožđa s plemenitom pljesni. Nije prikladan kao zobatica (Mirošević i Turković, 2003.).

Rajnski rizling je danas najviše raširen u sjevernoj Italiji, Australiji, Kaliforniji i državama zapadne Europe. Zanimljivo je da se sorta ne smije uzgajati u Francuskoj, osim u Alzasu (http://vinarija-safran.hr/rizling.html).



Slika 2. . Rajnski rizling (izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)

2.1.3.3. Pinot bijeli

Pinot bijeli (burgundac bijeli, pinot blanc)

Vinska sorta iz grupe Pinot, nastao mutacijom pupa iz pinota crnog, dozrijeva u drugom razdoblju. Oplodnja je dobra i redovita, otporan je na niske zimske temperature, vrlo je osjetljiv na *Botrytis* . Prirod mu varira ovisno o porijeklu sadnog materijala i klonu.

Nakuplja puno šećera i dovoljno ukupnih kiselina. Daje zaobljeno, skladno vino, svijetlo žute boje sa zelenkastim odsjajem, ugodne i specifične sortne arome. (Mirošević i Turković, 2003.).



Slika 3. Pinot bijeli (https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sorte/09_pinot_bijeli.html)

2.1.3.4. Pinot sivi

Pinot sivi (burgundac sivi, rulender)

Sorta iz grupe Pinot, nastao mutacijom pupa iz pinota crnog, dozrijeva u drugom razdoblju. Grožđe je karakteristične sivkasto plave boje, obično nakupi dovoljno šećera, daje vina vrhunske kakvoće, prinosi su niži, ali iznimne kakvoće. Osjetljiviji je na *Botrytis*, otporan na niske zimske temperature. Vrlo su tražena i cijenjena vina ove sorte. Vino je žućkaste svijetlo sive boje, mekano, prepoznatljive sortne arome. Posebna pozornost se treba obratiti pri preradi grožđa. (Mirošević i Turković, 2003.).

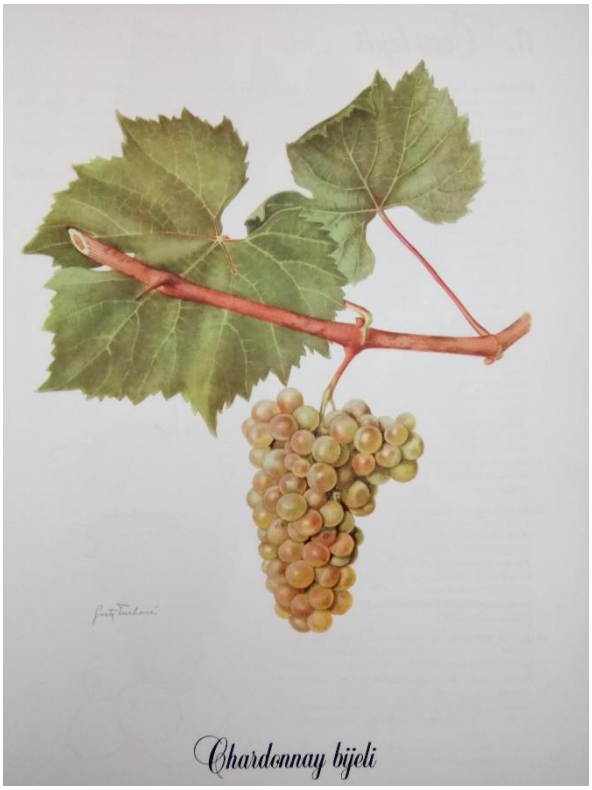


Slika 4. Pinot sivi (izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)

2.1.3.5. Chardonnay

Potječe iz Francuske. Dugo je vremena smatran tipom Pinot-a bijelog, no utvrđeno je da je nastao spontanim križanjem Pinota (crnog) i Gauois blanc-a. Dozrijeva u drugom razdoblju, oplodnja je dobra, rodnost dobra i redovita. Vrlo je osjetljiv na *Botrytis* , otporan je na niske zimske temperature.

Daje obično visokokvalitetna vina, svijetlo žućkasto zelene boje, fine, svojstvene i ugodne sortne arome, dobrih i postojanih kiselina.
U posljednje vrijeme jedna od najtraženijih sorata na domaćem i stranom tržištu. Postoji mnogo klonova, kod muškatnog klona se osjeća ugodni muškatni miris. (Mirošević i Turković, 2003.).



Slika 5. Chardonnay (izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)

2.2. Biogeni amini

2.2.1. Prisutnost biogenih amina u pjenušavom vinu

Novi trendovi na području sigurnosti hrane povećali su fokus na elemente i spojeve u tragovima koji mogu utjecati na ljudsko zdravlje, u koje se ubrajaju i biogeni amini. Biogeni amini su biološki aktivni dušični spojevi male molekulske mase. Prisustvo biogenih amina, u vinu sve je važnije kako proizvođačima, tako i potrošačima, jer predstavlja opasnost za zdravlje osjetljive populacije. To su dušične organske baze niske molekulske mase koje mogu imati alifatsku, aromatsku ili heterocikličku strukturu. Široko su rasprostranjeni u fermentiranim pićima, uglavnom kao produkti dekarboksilacije slobodnih aminokiselina, koje su prekursori njihovog nastajanja (Vincenzini i sur., 2009).

U vinu se od biogenih amina najčešće nalaze histamin, putrescin, β-feniletilamin i tiramin (Košmerl i sur., 2013; Čuš i sur., 2013; Soufleros i sur., 2007; Marcobal i sur., 2005). Europska Unija nije zakonski regulirala količinu biogenih amina u vinu, nego je samo dala preporuku, tzv. „Safety threshold values“ (EFSA, 2011).

Sadržaj biogenih amina proizvedenog u pjenušavom vinu u velikoj mjeri ovisi o izobilju prekursora aminokiselina u mliječi grožđa, jer se u cjelini biogeni amini povećavaju s povećanjem sadržaja aminokiselina. Na sadržaj aminokiselina može utjecati način vinifikacije, sorta vinove loze, zemljopisno podrijetlo i berba (Soufleros i sur., 1998; Moreno-Arribas i sur., 2000). Dok neki faktori povećavaju sadržaj prekursora aminokiselina, drugi čimbenici utječu na rast i enzimsku aktivnost mikroorganizama koji mogu stvarati biogeni amini.

2.2.2. Nastanak biogenih amina u pjenušavom vinu

Dvije grupe mikroorganizama koje imaju utjecaj na stvaranje različitih vrsta biogenih amina su kvasci i bakterije mliječne kiseline. Uočeno je da je utjecaj kvasaca znatno manji. Činjenica je da je prikupljeno puno više podataka da bakterije mliječne kiseline doprinose nastanku biogenih amina.
Isto je i u prisutnosti i djelovanju gljivice *Botritys cinereae* koja uzrokuje promjene u sastavu grožđa.

Alkoholna fermentacija koja se odvija uz sudjelovanje autohtonih kvasaca i komercijalnih sojeva *Saccharomyces cerevisiae* ne proizvodi značajnu koncentraciju biogenih amina. Dokazano je da kvasci nisu odgovorni za nastanak većine amina koji se mogu naći u industrijskoj proizvodnji crnih vina. Kvasci mogu utjecati na povećanu koncentraciju biogenih amina u vinu tijekom spontane i pobuđene fermentacije. U 'rose' vinima različiti sojevi *Saccharomyces cerevisiae* mogu povećati koncentraciju biogenih amina. Utvrđeno je također da inokulirani mošt daje vina sa višim koncentracijama biogenih amina nego što je to kod spontane fermentacije provedene pomoću autohtonih kvasaca (Smit i sur., 2008.). Najviše koncentracije biogenih amina stvorit će kvasci *Brettanomyces bruxellensis* i *Saccharomyces cerevisiale.*

Kroz dugi vremenski period pojava biogenih amina u vinu bila je povezivana uglavnom sa lošim higijenskim uvijetima u vinarijama.

Promatrana je kao mana vinima uzrokovana raznim sojevima bakterija mliječne kiseline koje u prisutnosti aminokiselina stvaraju biogene amine.To se posebno odnosi na rod *Pediococcus*, zastupljen u proizvodnji histamina.
Došlo se do zaključka da bakterija *Oenococcus oeni* iako se dovodi u vezu s malolaktičnom fermentacijom također provodi dekarboksilaciju histidina u histamin (Konig i sur., 2009.).

Brojnim provedenim istraživanjima potvrđeno je da koncentracija amina nastalih pomoću bakterija mliječne kiseline ovisi o samom soju bakterije a ne o nekim specifičnostima vrste.

Pojavu biogenih amina možemo bitno smanjiti inokulacijom vina selekcioniranim bakterijama da se spriječi spontana malolaktična fernentacija.

Povećani sadržaj amina već u samom grožđu može uzrokovati gljivica *Botrytis cinerea*. Ako dospije u kožicu bobice uzrokuje biotički stres loze i u bobici mijenja zastupljemost aminokiselina, ugljikohidrata i amina u korist amina, a udio vode se smanjuje (Smit i sur., 2008.).Ta se pojava koristi u tehnologiji proizvodnje predikatnog vina Tokaj u Mađarskoj. Zdravom grožđu se dodaje dio grožda s plemenitom plijesni i tako se dobije znatno veća koncentracija biogenih amina nego u normalnom vinu istog kultivara. Metabolička aktivnost gljiva pospješuje nastajanje biogenih amina i aktivnost bakterija nepoželjnih u vinu.

2.2.3. Čimbenici koji utječu na nastanak biogenih amina u pjenušavom vinu

Postoji mogućnost uporabe lizozima zajedno s SO_2 da odgodi ili inhibira rast . Lizozim je enzim koji može uzrokovati raspadanje stanične stijenke Gram-pozitivnih bakterija, a pH vrijednost grožđa ili vina može biti visoka za održavanje aktivnosti lizozima.

Na zastupljenost aminokiselina u vinu utječu metoda vinifikacije, sorta grožđa, geografski položaj, godina berbe i još neki drugi čimbenici. Povećanjem sadržaja aminokiselina raste i sadržaj biogenih amina(Košmerl i sur., 2013).

Amini putrescin i spermidin mogu biti prisutni u samom grožđu. Visoka koncentracija putrescina, spermidina i kadaverina nalazi se u sorti Cabernet sauvignon u perikarpu bobice i sjemenkama.

Putrescin je amin uvjetovan više geografskim položajem i sortom grožđa, nego postupkom proizvodnje. Na razinu amina u konačnom proizvodu još utječu vrsta tla, zrelost grožđa i upotreba dušikovih gnojiva (Smit i sur.,2008).

Uočene su i razlike u koncentraciji biogenih amina između različitih kultivara. U nekoliko istraživanja je utvrđena viša koncentracija biogenih amina kod Pinota crnog u odnosu na druga crna vina (Soleas i sur.,1999). U različitim berbama ta koncentracija varira zato što su razlike u koncentracijama aminokiselina, vrstama bakterija na grožđu i vrstama kvasaca.

Maceracija kao važan postupak u proizvodnji vina potpomaže ekstakcijubfenola, proteina, polisaharida i aminokiselina iz bobica grožđa. Veću količinu biogenih amina sadrži mošt koji je duže vrijeme stajao u kontaktu s kožicom bobice. To je jako važno kod maceracije na nižim temperaturama. Kod vina koja su duže bila na talogu koncentracija metilamina i putrescina je veća jer su se proteini hidrolizirali do peptida i potom razgradili do aminokiselina i amina (Košmerl i sur., 2013.).

U cijelom tom procesu nastanka biogenih amina bitan je i pH koji utječe na raznovrsnost bakterija i biološku aktivnost. Pri višem pH raznovrsnija je bakterijska mikroflora i dolazi do povećane produkcije biogenih amina. U procesu alkoholne i malolaktične fermentacije dolazi do promjene udijela biogenih amina u vinu. Alkoholnom fermentacijom se količina amina bitno ne povećava (Konig i sur., 2009.).

Malolaktična fermentacija zato znatno povećava koncentaciju biogenih amina i zato je iznimno važno odmah po završetku malolaktične fermentacije spiječiti djelovanje bakterija mliječne kiseline i tako smanjiti nastanak biogenih amina.

2.2.4. Toksičnost biogenih amina

Toksičnost biogenih amina dokazana je u alkoholnim pićima, posebice vinu, jer etanol može povećati toksične učinke izravnim ili neizravnim inhibiranjem enzima odgovornih za detoksikaciju tih spojeva (Smit i sur., 2008). Ljudski organizam lako podnosi nisku količinu biogenih amina jer se to učinkovito razgrađuje enzimima mono i diamino-oksidaze u crijevnom traktu (Moreno-Arribas i Polo, 2007).

Iako postoje razlike u individualnoj osjetljivosti na opijanje od strane biogenih amina, nekoliko farmakoloških reakcija može se dogoditi nakon prevelikog unosa tih spojeva. Najpoznatije reakcije su one uzrokovane histaminom. Poznato je da histamin izaziva osip, edem, glavobolje, hipotenziju, povraćanje, palpitaciju, proljev i srčane probleme (Landete i sur., 2005). Tiramin i feniletilamin mogu proizvesti hipertenziju oslobađanjem noradrenalina i norepinefrina, odnosno vazokonstriktora. Putrescin i kadaverin, iako sami netoksični, pogoršavaju štetne učinke histamina, tiramina i β-feniletilamina, budući da utječu na enzime koji ih metaboliziraju. Štoviše, putrescin i kadaverin mogu imati negativne učinke na aromu vina, dajući im okuse truljenja ili pokvarenog mesa (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

Uz toksični učinak neki biogeni amini također imaju i druge negativne posljedice, osobito glede osjetilnih svojstava vina i time ekonomske implikacije. Studija provedena od strane (Rohna i sur. 2005) pokazala je da visoki sadržaj histamina u vinu identificira dobro obučene procjenitelje vina. U toj studiji koja opisuje osjećaj u ustima ("mouthfeel descriptors") koriste se dva termina kao opis: "iritacija dubokog grla" i "jezičak". Nema posebnoga okusa koji se može pripisati histaminu. Putrescin, što je najčešći biogeni amin u vinu, može smanjiti osjetilnu kvalitetu vina pri koncentraciji od 15-20 mg/L u bijelom i 20-30 mg/L u crvenim vinima .

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Pjenušavo vino

Postupak proizvodnje osnovnog vina

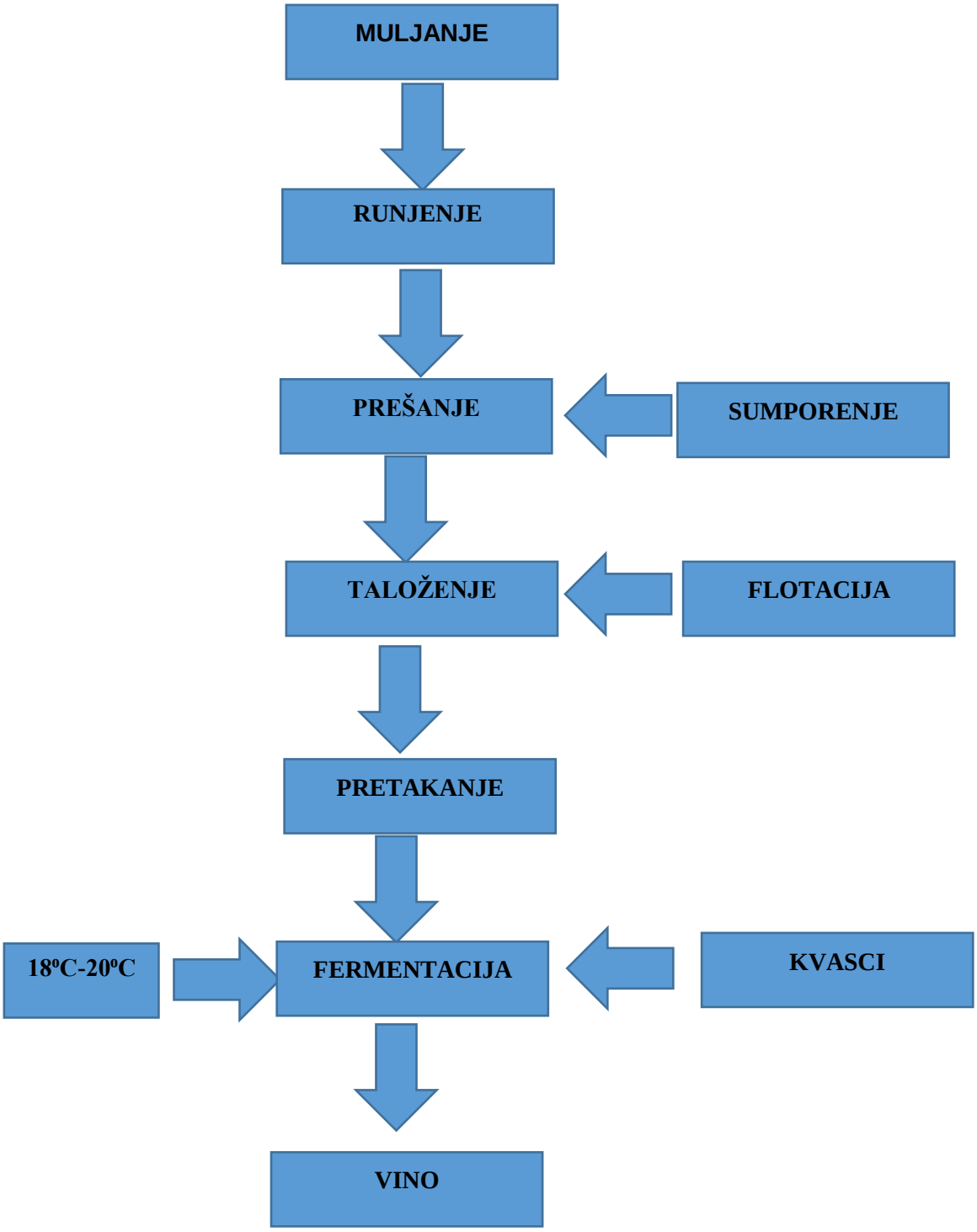
Pjenušava vina su vina koja sadrže određenu količinu CO_2, što znači da se vino u boci nalazi pod određenim pritiskom, a jačina pritiska ovisi o tipu vina odnosno o količini CO_2.

Osnovno vino proizvedeno je standardnim postupkom, muljanje i runjenje grožđa koje je na mjesto prerade dovezeno u prikolicama u rasutom stanju ili u gajbama za grožđe. Prešanje se vrši u pneumatskim prešama. U tek isprešan mošt dodaje se SO_2 i vinovodima se crpkama prebacuje u tankove predviđene za taloženje odnosno u ovom slučaju flotiranje.

Kada je proces flotiranja završen, mošt se pretače u inox tankove koji su predviđeni za alkoholnu fermentaciju koja se odvija pri temperaturi od 18 do 20°C koja se potpomaže sa selekcioniranim kvascima.

Osnovna vina proizvedena su iz grožđa sorti: Graševina (Welschriesling) - 25%, Pinot bijeli - 25%, Pinot sivi - 25% i Chardonnay - 25%.

Osnovna vina proizvedena su klasičnim postupkom, fermentacijom s kvascem Fermol-Bouqet 125, u kontroliranom temperaturnom režimu 16 – 22 °C. kako je to prikazano na slici br. 6. Prosječno trajanje fermentacije bilo je 42 dana.



Slika 6. shema proizvodnje osnovnog vina

Sekundarna fermentacija ("Champenois metoda") provedena je u bocama za pjenušce (750 mL), u kojima je baznom vinu dodano 22 gL-1 šećera. Jedna šarža proizvedena je pomoću imobiliziranih stanica kvasaca prema postupku (Miličević i sur., 2017), a druga klasičnom metodom. Svaka šarža imala je 5 boca (paralela).

Analize su provedene nakon 12 mjeseci odležavanja (Europska komisija propisuje da je minimalni period odležavanja za pjenušce 9 mjeseci), nakon degoržacije. Boce su napunjene samim pjenušcem u svrhu proizvodnje Brut pjenušca (Liqueur d'expédition nije dodan). Za enološke analize iz uzorka je miješanjem na magnetskoj miješalici uklonjen CO_2.

Nakon što je proizvedeno osnovno vino u ovom istraživanju provedena je sekundarna fermentacija u boci u standardnim 750 mL bocama za pjenušava vina s preračunatim dodatkom šećera 22 g/L. Kako bi se u sekundarnoj fermentacija mogla stvoriti potrebna količina CO_2 osnovno vino je inokulirano čistom kulturom selekcioniranih slobodnih stanica vinskog kvasca Lalvin EC 1118. Pa-Vin d.o.o. RH, kod uzorka br. 1 te imobiliziranim stanicama istih selekcioniranih vinskih kvasca Lalvin EC 1118. kod uzorka br. 2

Kod uzorka br.3 korišteni su kvasci ProElif, – Scott Laboratories sa sjedištem u Kanadi, te imobilizirane stanice istog kvsca za uzorak br. 4. Boce su zatvorene krunastim zatvaračem i položene horizontalno u podrumu Kutjevo d.d. konstantne temperature interval od 13 do 16°C. Analize su provedene sukladno odredbama (Council Regulation (EC) No. 1493/1999) nakon dozrijevanja od 12 mjeseci.

U ovom istraživanju korišten je postupak imobilizacije kvasaca kalcij-alginatom (Miličević i sur., 2017), pri čemu je dodano 9 g kalcij alginata u 300 ml vode, sve zajedno se miješalo dok se sav kalcij alginat u potpunosti nije otopio.

Dobivena otopina sadrži 3% alginata, a zatim je u otopinu Ca-alginata dodano 250 g stanica selektiranih kvasca (ProElif za jednu šaržu uzoraka i Lalvin EC 1118, za drugu šaržu uzoraka).

Nakon što je dobivena otopina uslijedilo je formiranje mikro-kapsula dodavanjem otopine kalcij alginata i kvasaca u pripremljenu otopinu vode i 0,05M CaCl2. Postupak se provodi uz pomoć dizne koja izravno kaplje sa visine od 20 cm.

Kada je kalcij alginat i kvasac odnosno kapljica došla u kontakt sa otopinom dolazi do formiranja mikrokapsule koja je u obliku kuglice, a veličine 0,5-2 mm. Kada je prošlo 60-120 minuta kuglice sa kalcij alginatom i kvascem potpuno su očvrsnule i bile spremne za fermentaciju.



Slika 7. Talog pri klasičnom načinu fermentacije (izvor: Kutjevo d.d.)



Slika 8. Talog pri fermentaciji s imobiliziranim kvascima (izvor: Kutjevo d.d.)

3.2. Metode

3.2.1. Fizikalno kemijske metode

Osnovni parametri kakvoće koja je odgovorna za utjecaj fermentacije na kakvoću vina i profil arome odabrane su kemijske i fizikalno-kemijske analitičke tehnike koje su visoko kompatibilne s kromatografskim i senzorskim metodama čime se objektivno definira kakvoća.

Enološka kvaliteta vina određena je klasičnim metodama prema O.I.V. (2001; 2008) i hrvatskom zakonodavstvu (Zakon o vinu, NN96/03 s izmjenama i dopunama; Pravilnik o vinu NN 96/96 s izmjenama i dopunama).

Fizikalno-kemijske analize uključivale su određivanje specifične mase, alkohola, ukupnog ekstrakta, ukupnih šećera, ukupnih i hlapljivih kiselina, ukupnog i slobodnog SO_2, ukupnog dušika, pepela i tlaka.

U uzorcima pjenušaca određivani su sljedeći parametri:

- specifična težina (20/20 ºC) – piknometrijski
- alkohol (% vol.) – piknometrijski na 20 ºC
- ukupni ekstrakt (g/L) – uparavanjem u vodenoj kupelji i sušenjem na 105 °C, do konstantne mase
- ukupni šećer (g/L) – gravimetrijski
- ukupne kiseline (g/L) – titracijom s 0,1 mol/L (NaOH) uz fenolftalein kao indikator
- pepeo (g/L) – spaljivanjem i mineralizacijom, pri 525 ± 25 ºC
- slobodni SO_2 (mg/L) – titrimetrijskom metodom po OIV – u
- ukupni SO_2 (mg/L) – titrimetrijskom metodom po OIV – u
- ukupni dušik (mg/L)
- hlapljiva kiselina (g/L

3.2.2. HPLC metoda analize

Sadržaj biogenih amina u vinu određen je metodom prema Paris Soleas i sur. (1999), pomoću tekućinskog kromatografa HP 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka), s autosamplerom i UV/VIS detektorom s promjenjivim valnim dužinama i fluorescentnim detektorom.

Separacija je provedena nakon derivatizacije s danzil kloridom (DNSCL), na koloni za kromatografiju obrnutih faza Zorbax Eclipse XDB C8 (150 mm × 4,6 mm, veličina čestica 5 μm) s predkolonom Meta Guard Inertsil C18.

Standard za biogene amine je proizveden u Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka, a DNSCL za flourescentni detektor u Merck, Darmstadt, Njemačka. Statistička analiza provedena je pomoću Statistica® softwarea, uz primjenu t-testa s pouzdanošću 95%.

4. REZULTATI

Tablica 2. Rezultati fizikalno kemijske analize

Parametar kakvoće	uzorak 1	uzorak 2*	uzorak 3	uzorak 4*
Specifična težina (20/20 °C) (g/mL)	0.9917 ± 0.15	0.9915 ± 0.35	0.9940± 0.25	0.9935 ± 0.25
Alkohol (%vol.)	13.25 ± 0.15	13.35 ± 0.25	12.90 ± 0.20	12.95 ± 0.30
Ukupni ekstrakt (g/L)	19.65 ± 0.05	19.55 ± 0.25	22.60 ± 0.42	22.55 ± 0.30
Ukupni šećer (g/L)	2.70 ± 0.10	2.65 ± 0.30	3.45 ± 0.35	3.35 ± 0.35
Ukupne kiseline (g/L)	5.25 ± 0.08	5.15 ± 0.35	6.00 ± 0.35	5.*95 ± 0.40
Pepeo (g/L)	1.65 ± 0.10	1.75 ± 0.18	2.00 ± 0.40	1.95 ± 0.25
Slobodni SO_2 (mg/L)	6.25 ± 0.18	6.35 ± 0.25	5.85 ± 0.18	5.90 ± 0.10
Ukupni SO_2 (mg/L)	115.55 ± 0.20	116.40 ± 0.20	115.00 ± 0.10	115.33 ± 0.18
Ukupni dušik (mg/L)	250.50 ± 0.20	250.00 ± 0.10	225.00 ± 0.10	220.50 ± 0.10
Tlak (bar)	5,00	5,05	5,15	5,10

*- svi rezultati su prosječna vrijednost četiri mjerenja

Uzorak 1 (klasična metoda) - klasična metoda sekundarne fermentacije

Uzorak 2 (imobilizirani kvasci) - imobilizirane stanice Ca-alginate

Uzorak 3 (klasična metoda) - klasična metoda sekundarne fermentacije

Uzorak 4 (imobilizirani kvasci) - imobilizirane stanice Ca-alginate

Tablica 3. HPLC analiza biogenih amina

Biogeni amini (mg/L)	**uzorak 1**	**uzorak 2***	**uzorak 3**	**uzorak 4***
putrescin	0.42 ± 0.20	0.42 ± 0.18	0.48 ± 0.03	0.49 ± 0.04
kadaverin	0.25 ± 0.10	0.24 ± 0.05	0.48 ± 0.05	0.50 ± 0.05
β-feniletilamin	0.37 ± 0.15	0.33 ± 0.15	1.50 ± 0.18	1.40 ± 0.18
spermidin	0.18 ± 0.11	0.15 ± 0.09	0.25 ± 0.09	0.21 ± 0.09
triptamin	1.69 ± 0.10	1.63 ± 0.12	1.89 ± 0.17	1.74 ± 0.17
serotonin	0.18 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.13 ± 0.05
tiramin	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.20 ± 0.02
histmin	2.21 ± 0.10	2.25 ± 0.10	2.49 ± 0.05	2.28 ± 0.05
Σ biogeni amini	**5.49**	**5.35**	**7.50**	**6.95**

*-svi rezultati su proječna vrijednost četiti mjerenja

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na fizikalno-kemijske osobine pjenušavog vina

Tablica br. 2. prikazuje rezultate fizikalno-kemijske analize pjenušavih vina. Analiza se sastoji od dva tretmana, odnosno četiri uzorka, a od toga su dva pjenušca koji su proizvedeni klasičnim postupkom sekundarne fermentacije i dva koji su proizvedeni s imobiliziranim kvascima. Imobilizacija je provedena Ca-alginatom .

Primjena imobiliziranih kvasaca relativno je nova tehnologija u proizvodnji pjenušavih vina. U usporedbi s tradicionalnom "Champenoise metodom" ima nekoliko prednosti u pogledu cijene i kontrole fermentacije.

Dobiveni rezultati za specifičnu težinu nemaju veliko odstupanje s obzirom na metodu sekundarne fermentacije (0,9917 g/mL klasičnom metodom 0,9915 g/mL imobiliziranim kvascima),ali je značajna razlika kod druge vrste kvasca gdje su rezultati veći i iznose (0,9940 g/mL klasičnom metodom i također niža vrijednost 0,9935 g/mL kod upotrebe imobiliziranih stanica kvasca).

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju (Tablica 2) pokazuju da je vino proizvedeno pomoću imobiliziranih stanica kvasca imalo blago povišeni udio alkohola (13,35 % u odnosu na 13,25 % kod klasičnog postupka za kvasac Lalvin EC 1118, kao i 12,95% u odnosu na 12,90% za kvasac ProElif). Količina alkohola u oba slučaja u skladu je s hrvatskim zakonodavstvom (Pravilnik o vinu, NN 96/96).

Statistički značajna razlika uočena je u sadržaju ukupnog ekstrakta 19,55 g/L za kvasac Lalvin EC 1118 te 22,55 za kvasac ProElif ako se koristi imobilizirani kvasac kao i nešto više vrijednosti , 19,65 odnosno 22,60 korištenjem klasične metode koji je značajno niži kod postupka s imobiliziranim kvascima.

Kod pjenušca proizvedenog klasičnim postupkom udio ukupnog ekstrakta bio je unutar preporučenog raspona.

Ukupni ekstrakt odgovara karakteristikama kvalitetnih vina dobivenih iz odabranih sorti grožđa proizvedenog klasičnim postupkom .

Ukupni šećeri su za obije vrste kvasaca nešto viši kod uzoraka u kojima je provedena klasična metoda sekundarne fermentacije (2,70 g/L odnosno 3,45 g/L) od onih koncentracija šećera koji su nastali pri uporabi imobiliziranih kvasaca (2,65 g/L odnosno 3,35 g/L).

U uzorcima koji su proizvedeni imobiliziranim kvascima statistički je značajana razlika u udijelu ukupnih kiselina (5,15 g/L odnosno 5,95 g/L) koje su niže nego kod uzoraka proizvedenim klasičnom metodom (5,25 g/L odnosno 6,00 g/L) što je u skladu s rezultatima istraživanja Delfini *i sur.* (2001).

Za koncentraciju pepela smo dobili rezultat u slučaju Lalvin EC 1118 imobiliziranog kvasca viši (1,75 g/L) dok je kod drugog imobiliziranog kvasca tj. ProElif bio niži (1,95 g/L) prema vrijednostima kod klasične metode.

Slobodni SO_2 je viši u uzorcima proizvedenim imobiliziranim kvascima (6,35 mg/L i 5,90 mg/L) nego u uzorcima proizvedenim klasičnom metodom (6,25 mg/L i 5,85 mg/L).

Ukupni SO_2 je neznatno viši u uzorcima proizvedenim imobiliziranim kvascima (116,40 mg/L i 115,33 mg/L).Dobivene vrijednosti klasičnom metodom su (115,55 mg/L i 115,00 mg/L) nešto malo niže.

Koncentracija ukupnog dušika viša je u uzorcima dobivenih klasičnom metodom (250,50 mg/L i 225,00 mg/L) od onih koje smo dobili metodom koristeći imobilizirane kvasce (250,00 mg/L i 220,50 mg/L).

Rezultat mjerenja dobiven za tlak u barima kod imobiliziranog kvasca Lalvin EC1118 je nešto viši (5,05 bara) dok je za ProElif vrstu imobiliziranog kvasca nešto niži (5,10 bara) ako se usporedi s vrijednostima dobivenim klasičnom metodom (5,00 bara odnosno 5,15 bara).

5.2. Utjecaj fermentacije s imobiliziranim stanicama kvasca na prisutnost biogenih amina u pjenušavom vinu

U tablici br 3. prikazani su podaci prisutnosti biogenih amina u pjenušavim vinima. HPLC (metoda tekuće kromatografije visoke djelotvonosti) je metoda koja je korištena za dobivanje prikazanih rezultata koji potvrđuju da je metoda sekundarne fermentacije utjecala na sadržaj biogenih amina u pjenušavim vinima.

U pjenušcima proizvedenim s imobiliziranim stanicama kvasca količina biogenih amina je 5,35 mg/L odnosno 6,95mg/L dok je u klasično proizvedenim uzorcima taj sadržaj bio 5,49 mg/L,odnosno 7,50mg/L .

Najzastupljeniji biogeni amin u uzorcima bio je histamin sa 2,25 mg/L odnosno 2,28 mg/L u uzorcima s imobiliziranim kvascima. U uzorcima klasične metode iznosio je 2,21mg/L odnosno 2,49mg/L , zato što na produkciju histamina utječe čitavi niz enoloških faktora – od pripreme sirovine do kraja postupka fermentacije (Halasz i sur., 1994, Bauza i sur., 1995, Gerbaux i Monamy, 2000., Landete i sur., 2005.). Nakon njega slijedi tripamin (1,66 i 1,81 mg/L), kao u istraživanju (Gloria i sur. 1998).

Kako je prikazano u Tablici 3, koncentracija putrescina bila je relativno niska u svim uzorcima (0,42 mg/L i 0,48mg/L), zato što je fermentacija provedena komercijalnom čistom kulturom (Gerbaux i Monamy, 2000). Sličan trend pokazali su i ostali analizirani biogeni amini.

Način fermentacije imao je očiti utjecaj na koncentraciju putrescina, kadaverina i ß-feniletilamina, pri čemu je značajno niži udio navedenih spojeva utvrđen kod uzoraka proizvedenih tehnologijom imobiliziranih stanica kvasca.

Kadaverin je prisutan u koncentraciji (0,25 mg/L) u uzorku broj 1 te (0,48 mg/L) u uzorku broj 3 u kojima je sekundarna fermentacija provedena klasičnom metodom . U uzorcima 2 i 4 koji su dobiveni u prisutnosti imobiliziranih kvasaca, vrijednosi su (0,24 mg/L) te (0,50 mg/L).

ß-feniletilamin pokazuje veće rezultate ako se koristi kvasac ProElif (1,50 mg/L) za klasičnu metodu sekundarne fermentacije i (1,40 mg/L) ako se koristi imobilizirani kvasac. Za kvasac Lalvin EC 1118 vrijednosti su (0,37 mg/L) u klasičnoj metodi sekundarne fermentacije te (0,33 mg/L) u metodi sa imobiliziranim kvascem.

Spermidin je izmjeren u nižim vrijednostima (0,15mg/L i 0,21mg/L) u metodi s imobiliziranim kvascima,dok su u klasičnoj metodi izmjerene vrijednosti od (0,18mg/L i 0,25mg/L).

Triptamin je niži ako se u postupku poizvodnje koriste imobilizirani kvasci (1,63mg/L i 1,74mg/L) .Vrijednosti dobivene klasičnom metodom su (1,69mg/L i 1,89mg/L) triptamina.

Isti trend pokazuju i dobivene vrijednosti za serotonin i tiramin. I jedan i drugi analit imaju nižu vrijednost kod postupka sekundarne fermentacije provedene imobiliziranim stanicama kvasca (serotonin 0,15mg/L i 0,13mg/L, tramin 0,18mg/L i 0,20mg/L).U klasičnoj metodi sekundarne fermentacije analizom smo dobili vrijednosti (serotonin 0,18 mg/L i 0,16 mg/L,tiramin 0,19 mg/L i 0,25 mg/L).

6. ZAKLJUČAK

Rezultati dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da način provedbe fermentacije utječe na najzastupljenije biogene amine u vinu: histamin, putrescin, kadaverin, *ß*-feniletilamin i tiramin.

Primjenom imobiliziranih stanica kvasca u sekundarnoj fermentaciji pjenušavih vina značajno se smanjuje udio navedenih spojeva u pjenušavim vinima.

Osim toga, nije potrebno okretanje boca tijekom sekundarne fermentacije, što značajno olakšava njenu provedbu.

Iz svega navedenoga može se zaključiti da je fermentacija s imobiliziranim kvascima obećavajući pristup proizvodnji pjenušavih vina.

7. LITERATURA

Alcaide-Hidalgo, J.M., Moreno-Arribas, M.V., Martın-Alvarez, P.J., Polo M.C. (2007): Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines, *Food Chem.* 103, 572-581.

Bauza, T., Blaise, A., Daumas, F., Cabanis, J.C. (1995): Determination of biogenic amines and their precursor amino acids in wines of the Vallee du Rhone by high-perfomance liquid chromatography with precolumn derivatisation and fluorimetric detection, *Journal of Chromatography A*, 707, 373–379.

Čuš, F., Bach, B., Barnavon, L., Žnidaršič Pongrac, V. (2013): Analytical determination of Dolenjska region wines quality, *Food control* 33, 274-280.

Delfini, C., Cocito, C.H., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., Baiocchi, C. (2001): Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas, *Journal of Agricultural and Food Chemisty* 48, 1789 – 1798.

Gerbaux, V., Monamy, C. (2000): Biogenic amines in Burgundy wines. Content and origin in wines, *Rev. Fr. Oenol.* 183, 25-28

EFSA Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 2393.

Gloria, M.B.A., Watson, B.T., Simon-Sarkadi, L., Daeschel, M.A. (1998): A survey of biogenic

amines in Oregon Pinot noir and Cabernet Sauvignon wines, *Am. J. Enol. Vitic*. 49, 279-282.

Halasz, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. (1994): Biogenic amines and their production by microrganisms in food, *Trends Food Sci. Technol.* 5, 42–49.

Košmerl, T., Šućur, S., Prosen, H. (2013): Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine, *Acta agriculturae Slovenica* 101, 249 – 261.

https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sav_pjenusava_vina.html

Landete, J.M., Ferrer, S., Pardo, I. (2005): Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine, *J.Appl. Microbiol.* 99, 580-586.

Marcobal, A., Polo, M.C., Martin-Alvarez, P.J, Moreno-Arribas, M.V. (2005): Biogenic amine content of red Spanish wines: comparation of a direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines, *Food Res. Int.* 38, 387-394.

Miličević, B., Babić, J., Ačkar, Đ., Miličević, R., Jozinović, A., Jukić, H., Babić, V., Šubarić, D. (2017) Sparkling Wine Production by Immobilised Yeast Fermentation. *Czech J. Food Sci.* 35(2), 171–179

Mirošević, N., i suradnici (2011.): Atlas hrvatskog vinogradarstva i vinarstva, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb

Mirošević, N., Turković, Z. (2003.): Ampelografski atlas, Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb

https://www.mladina.hr/mala-skola-pjenusaca/

https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2004_07_102_1990.html

Radovanović, V. (1970.): Tehnologija vina, Građevinska knjiga, Beograd

Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E., Zotou, A., Loukou, Z. (2007): Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection aft er dansylation and examination of factors aff ecting their presence and concentration, *Food Chem*. 101, 704–716.

Sokolić, I. (1976.): Zlatna knjiga o vinu, Otokar keršovani, Rijeka

www.veleri.hr

Vincenzini, M., Guerrini, S., Mangani, S., Granchi, L. (2009): Amino Acid Metabolisms and Production of Biogenic Amines and Ethyl Carbamate. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine,Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 167-176

(http://vinarija-safran.hr/rizling.html)

8. SAŽETAK

Novi trendovi na području sigurnosti hrane povećali su fokus na elemente i spojeve u tragovima koji mogu utjecati na ljudsko zdravlje, u koje se ubrajaju i biogeni amini. Biogeni amini su biološki aktivni dušični spojevi male molekulske mase. U vinu mogu nastati iz prekursora, djelovanjem mikroorganizama u bilo kojoj fazi proizvodnje. Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na sadržaj biogenih amina u pjenušcu. Kvantitativno određivanje provedeno je pomoću RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) te je utvrđeno da je pjenušac proizveden pomoću imobiliziranih kvasaca sadržavao niži udio biogenih amina.

Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je fermentacija imobiliziranim stanicama kvasca značajno utječe na formiranje biogenih amina.

Ključne riječi: biogeni amini, imobilizirani kvasci, pjenušac

9. SUMMARY

Recent trends in food safety are promoting an increasing search for trace compounds that can affect human health, biogenic amines belong to this group of substances. Biogenic amines are basic nitrogenous low molecular weight compounds with biological activity. Biogenic amines in the wine can be formed from their precursors by various microorganisms present in the wine, at any stage of production. The aim of the present work was to investigate the changes of the content of biogenic amines in sparkling wines produced by fermentation method with immobilized yeast cells. Biogenic amines were quantified using a reversedphase high performance liquid chromatography (HPLC).

From the results obtained in this study, it can be concluded that immobilized yeast cells technology can influence the formation of biogenic amines.

Key words: biogenic amines, immobilized yeast cells, sparkling wine

10. POPIS TABLICA

Red. br.	Naziv tablice	Str.
1.	Utjecaj sadržaja alkohola na odmjeravanje šećera pri šampanjizaciji	4
2.	Rezultati fizikalno kemijske analize	24
3.	HPLC analiza biogenih amina	25

11. POPIS SLIKA

Red. br.	Naziv slike	Str.
1.	Graševina (izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)	9
2.	Rajnski rizling(izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)	10
3.	Pinot bijeli(https://www.krizevci.net/vinograd/htm/sorte/09_pinot_bijeli.html)	11
4.	Pinot sivi(izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)	12
5.	Chardonnay(izvor: Ampelografski atlas, Mirošević, N., Turković, Z.)	13
6.	Shema proizvodnje osnovnog vina	19
7.	Talog pri klasičnom načinu fermentacije(izvor: Kutjevo d.d.)	21
8.	Talog pri fermentaciji s imobiliziranim kvascima(izvor: Kutjevo d.d.)	21

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Diplomski rad

Sveučilišni diplomski studij Voćarstvo, vinogradarstvo i vinarstvo; smjer Vinogradarstvo i vinarstvo

UTJECAJ IMOBILIZACIJE STANICA KVASCA NA PRISUTNOST BIOGENIH AMINA U PJENUŠAVIM VINIMA VINOGORJA KUTJEVO PROIZVEDENIM RAZLIČITIM POSTUPCIMA SEKUNDARNE FERMENTACIJE

Stjepan Sablek

Sažetak:

Novi trendovi na području sigurnosti hrane povećali su fokus na elemente i spojeve u tragovima koji mogu utjecati na ljudsko zdravlje, u koje se ubrajaju i biogeni amini. Biogeni amini su biološki aktivni dušični spojevi male molekulske mase. U vinu mogu nastati iz prekursora, djelovanjem mikroorganizama u bilo kojoj fazi proizvodnje. Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj fermentacije imobiliziranim kvascima na sadržaj biogenih amina u pjenušcu. Kvantitativno određivanje provedeno je pomoću RP-HPLC (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography).Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je fermentacija imobiliziranim stanicama kvasca značajno utječe na formiranje.

Rad je rađen pri: Fakultet agrobiotehnikih znanosti Osijek

Mentor: prof.dr.sc. Borislav Miličević

Broj stranica: 41

Broj grafikona i slika: 8

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 23

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: biogeni amini, imobilizirani kvasci, pjenušac

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. doc.dr.sc. Vladimir Jukić, predsjednik

2. prof.dr.sc. Borislav Miličević, mentor

3. doc.dr.sc. Mato Drenjančević, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Graduate thesis

Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek

University Graduate Studies,

EFFECT OF IMMOBILIZATION YEAST CELLS ON THE PRESENCE OF BIOGENIC AMINES IN SPARKLING WINE FROM KUTJEVO VINEYARDS PRODUCED BY DIFFERENT PROCEDURES OF SECONDARY FERMENTATION

Stjepan Sablek

Summary:

Recent trends in food safety are promoting an increasing search for trace compounds that can affect human health, biogenic amines belong to this group of substances. Biogenic amines are basic nitrogenous low molecular weight compounds with biological activity. Biogenic amines in the wine can be formed from their precursors by various microorganisms present in the wine, at any stage of production. The aim of the present work was to investigate the changes of the content of biogenic amines in sparkling wines produced by fermentation method with immobilized yeast cells. Biogenic amines were quantified using a reversedphase high performance liquid chromatography (HPLC).

From the results obtained in this study, it can be concluded that immobilized yeast cells technology can influence the formation of biogenic amines.
Key words: biogenic amines, immobilized yeast cells, sparkling wine

Thesis performed at Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek

Mentor: : prof.dr.sc. Borislav Miličević

Number of pages: 41

Number of figures and pictures: 8

Number of tables: 3

Number of references: 23

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: fermentation, immobilized yeast cells

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. doc.dr.sc. Vladimir Jukić, predsjednik

2. prof.dr.sc. Borislav Miličević, mentor

3. doc.dr.sc. Mato Drenjančević, član

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotehnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1